

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

ИЗОЛИРОВАНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТРАМАДОЛА ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF TRAMADOL FROM BIOLOGICAL MATERIAL

А.А. Волков^{1,2*}, В.А. Мищихин^{1,2}
A.A. Volkov^{1,2*}, V.A. Mishchikhin^{1,2}

¹ Бюро судебно-медицинской экспертизы Департамента здравоохранения Москвы

² ГОУ ВПО ММА им. И.М. Сеченова, кафедра токсикологической химии

¹ Bureau of Medicolegal Examination of Moscow Department of Public Health Care

² I.M. Sechenov Moscow Medical Academy, Department of Toxicological Chemistry

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: трамадол, эфир, изолирование, количественное определение

KEY WORDS: tramadol, ether, isolation, quantitative evaluation.

РЕЗЮМЕ: Предложен метод изолирования и определения трамадола эфиром из биологического материала. Дана количественная оценка результатов изолирования из ткани печени трупа человека.

ABSTRACT: Ether is recommended as an agent for extraction of tramadol from biological material. Optimal conditions for tramadol isolation from cadaveric human liver are defined and the results of isolation are quantitatively evaluated.

Трамадол, химическое название: **транс-(+)-2-[(диметиламино)-метил]-1-(3-метоксифенил)-циклогексанол** (в виде гидрохлорида), представляет собой синтетический опиоид со свойствами агониста-антагониста, анальгетик центрального действия средней силы, подобно кодеину, пентазацину или пропоксифену. Он широко и эффективно применяется для обезболивания в терапии и хирургии.

Лекарственное средство представляет собой гидрохлорид трамадола. Выпускается в виде растворов для инъекций, капель для орального применения, таблеток, капсул, свечей и используется в РФ под разными названиями: Трамагит, Трамадол, Трамадол Ланнахер, Трамадол Никомед, Трамадол-Акри, Трамадол-Словакофарма, Трамадол-ратиофарм, Трамазолин, Трамал, Трамал Ретард, Трамундин ретард.

На ранних стадиях изучения трамадола его относили к наркотическим анальгетикам. Дальнейшие исследования и опыт применения в клинической практике показали, что трамадол не продуцирует морфиноподобный эффект, имеет низкую наркотическую активность и не может служить заменой морфина при опиоидной наркомании для лиц с низкой или умеренной опиоидной зависимостью. По принятой в настоящее время классификации трамадол не является наркотиком и отнесен к сильнодействующим средствам. При назначении трамадола вводятся ограничения на некоторые виды деятельности, связанные с необходимостью проявлять быструю реакцию, а также рекомендуется избегать длительных периодов приема.

При немедицинском использовании трамадола лицами с опиоидной (героиновой) зависимостью в дозах, значительно превышающих терапевтические, наблюдается большое количество побочных эффектов, в том числе развитие пристрастия к препарату. В судебно-медицинской практике трамадол представляет интерес тем, что усиливает эффекты транквилизаторов, седативных, наркотических средств и алкоголя (Справочник Видаль, 1999; Веселовская, Коваленко, 2000; Энциклопедия лекарств, 2000).

При использовании в течении ряда лет метода изолирования токсических веществ подкисленным ацетонитрилом по методу Саломатина стало возможным провести качественное и количественное определение трамадола в биологическом материале (Методические рекомендации..., 1988).

Материалы и методы исследования

Объектом исследования явился трамадол (трамал

*Адрес для переписки:

Волков Алексей Анатольевич
ММА им. И.М. Сеченова, кафедра токсикологической химии,
121019 Россия, Москва, Никитский бульвар, д.13.

капсулы, содержащие 50 мг трамадола гидрохлорида) произведенный фирмой Грюненталь ГМБХ, ФРГ. Содержимое капсулы растворяли в дистиллированной воде (концентрация 1 мг/мл) и готовили модельные смеси исследуемого вещества с мелкоизмельченной тканью свежей печени от трупа человека.

Навеску биологического материала (50 г) измельчали, заливали двойным объемом ацетонитрила подкисленного 6 н раствором соляной кислоты до pH 2-3 по универсальному индикатору. Настаивали 30 минут на механической мешалке. Ацетонитрильное извлечение сливали, а настаивание с подкисленным ацетонитрилом проводили еще дважды с одинарным объемом по 15 минут. Объединенные ацетонитрильные извлечения помещали в делительную воронку содержащую 0,5 л 2,5% раствора сульфата натрия и экстрагировали эфиром три раза по 100 мл. Эфирные извлечения отделяли. Оставшийся водноацетонитрильный раствор подщелачивали 50% раствором едкого натра до pH 13 по индикатору "PHAN" и извлекали эфиром три раза по 100 мл. Эфирные извлечения объединяли и упаривали до объема 90 мл. Объем доводили эфиром до метки в мерной колбе на 100 мл. При исследовании полученных извлечений использовали хроматографию в тонком слое сорбента, УФ-спектрофотометрию.

Хроматографию проводили в тонком закрепленном слое силикагеля ЛС 5/40 в системах растворителей 1 – бензол; 2 – этилацетат-метанол-аммиак (85:10:5); 3 – этилацетат-хлороформ-аммиак (85:10:5). В качестве свидетеля использовали основание трамадола (раствор в хлороформе), время насыщения камеры – 30 минут, пробег фронта растворителей – 10 см. В качестве проявителей использовали реактив Драгендорфа модифицированный по Шталю и 0,01 н. серной кислотой, реактив Манделина (0,01 г ванадата аммония в 2 мл концентрированной серной кислоты), реактив Марки (1 капля формалина в 1 мл концентрированной серной кислоты). При проявлении реактивом Драгендорфа наблюдали образование красно-оранжевого пятна, реактивом Манделина – сине-зеленого пятна, реактивом Марки бурно-коричневого пятна переходящего в изумрудное при добавлении дистиллированной воды. Во всех системах обнаруженное вещество шло параллельно свидетелю – трамадолу. Предварительно хроматограмму можно рассматривать в УФ-свете. При этом в области хроматографирования свидетеля и исследуемого извлечения наблюдаются флуоресцирующие пятна (Clarke's..., 1986; Веселовская и др., 1988). Rf трамадола: 1 – 0,00; 2 – 0,62; 3 – 0,70.

Для спектрофотометрического обнаружения трамадола можно проводить хроматографическую очистку извлечения в тонком закрепленном слое сорбента или на пластинах типа Силуфол UV-254, с элюированием хлороформом. Хлороформ выпаривали досуха, остаток растворяли в 5 мл 0,1 н. раствора соляной кислоты и исследовали на спектрофотометре HP 8452 А в кювете L = 1 см в диапазоне длин волн 210-450 нм. При этом на спектрограмме наблюдали максимум поглощения при 272 нм и плечо при

278 нм. Параллельно в тех же условиях исследуется раствор свидетеля трамадола в 0,1 н. растворе соляной кислоты.

Количественно трамадол в модельных смесях определяли двумя методами:

1. Спектрофотометрически:

После хроматографической очистки элюирование проводили хлороформом. Остаток после испарения хлороформа растворяли в 5 мл 0,1 н раствора соляной кислоты. Измеряли оптическую плотность при 272 нм. Количество трамадола рассчитывали на спектрофотометре HP 8452 А, по калибровочному графику, построенному в режиме Quantitation с концентрацией 0,1 – 1,0 мг/мл. В данном интервале концентраций наблюдали четко выраженное соблюдение закона Бугера-Ламберта-Бера, результаты определения трамадола в печени от трупа в соответствии с разработанной методикой представлены в таблице 1. Среднее количество трамадола, определенного спектрофотометрическим методом, составило 54%.

2. ГХ/МС

Исследование проводилось на газовом хроматографе HP 5890 с масс-селективным детектором HP 5971А. Кварцевая капиллярная колонка, 30 м × 0,32 мм (привитая 5% фенилметилсиликоновая фаза, 0,25 мкм). Скорость потока газа-носителя гелия 1 мл/мин, без сброса. Температура термостата колонок – начальная 70°C (2 мин), программирование со скоростью 20°C/мин, конечная температура 280°C (17,5 мин), температура термостатов испарителя, детектора, интерфейса 280°C. Идентификация наблюдаемых на хроматограмме пиков проводилась с использованием библиотек масс-спектров Wiley и PMW TOXR. Сухой остаток извлечения из печени с помощью метанола переносился во флакон емкостью 1,5 мл, добавлялись 20 мкл атропина (вн. стандарт), растворитель упаривался, во флакон с помощью шприца вводилось 50 мкл реактива БСА (бис-триметилсилацетамид), флакон интенсивно встряхивался в течение 5 мин, затем 1 мкл вводился в испаритель хроматографа. На хроматограмме, полученной при исследовании извлечения из печени, наблюдались хроматографические пики: 10,28 мин – трамадол ТМС (97%) и 11,71 мин – атропин ТМС. При описанных выше условиях исследовались стандартные растворы трамадола (1,0 мг/мл) и атропина (0,132 мг/мл): 10,25 мин – трамадол (99%), 11,75 мин – атропин ТМС. Количественное определение трамадола в печени проводилось методом калибровки с

Таблица 1.

Внесено трамадола (в мг) на 50г печени	Найдено, %			
	1	2	3	4
0,50	51,3	49,8	50,5	50,6
2,00	56,1	55,4	52,4	55,6
5,00	53,1	54,3	51,9	57,1
10,00	57,2	58,1	53,7	56,3

внутренним стандартом атропином по площади молекулярного иона трамадола ТМС с массой 335 а.е.м. и молекулярного иона атропина ТМС – 361 а.е.м:

$$X = \frac{S_1 \times V_1 \times V_2 \times C \times 100}{S_2 \times V_3 \times m}$$

Где:

S_1 - отношение площади пика молекулярного иона трамадола ТМС (исследуемого) к площади пика молекулярного иона атропина ТМС.

C - концентрация стандартного раствора трамадола (1,0 мг/мл, или 1000 мкг/мл).

S_2 - отношение площади пика молекулярного иона трамадола ТМС (стандарта) к площади пика молекулярного иона атропина ТМС.

V_1 – объем реактива БСА.

V_2 – общий объем извлечения.

V_3 – объем извлечения взятый для анализа.

m – масса навески

Среднее количество трамадола, определенного методом ГХ/МС, составило 69%.

Как свидетельствуют полученные данные, содержание трамадола в модельных смесях в достаточно широком интервале концентраций (0,5-10 мг) при постоянной массе навески ткани печени (50 г) сопровождается лишь незначительным изменением значений степени извлечения, не превышающим 5%. Использование в качестве изолирующего агента эфира и предложенные условия изолирования позволяют достичь достаточно высокой степени извлечения анализируемого соединения из тканей печени от трупов. Предложенная методика хорошо воспроизводима, позволяет проводить количественное определение разными методами. Она может быть использована в практике при проведении экспертизы случаев отравления трамадолом, а также позволяет

проводить исследования на другие синтетические лекарственные препараты, изолирующиеся при этих условиях.

Выводы

1. Изучена возможность использования эфира в качестве изолирующего агента при химико-токсикологическом исследовании трамадола.
2. Определены условия изолирования трамадола эфиром из трупного материала.
3. Дана количественная оценка изолирования эфиром анализируемого соединения из модельных смесей с тканью печени двумя методами.
4. Предложенная методика изолирования трамадола достаточно универсальна для ряда синтетических лекарственных веществ.

Литература

- Методические рекомендации по химико-токсикологическому определению психотропных соединений фенотиазинового ряда. 1988. Казань. С.47.
- Веселовская Н.В., Коваленко А.Е. 2000. Наркотики. М.: Триада-Х. С.196-197.
- Веселовская Н.В., Кислун Ю.В. и др. 1996. Обнаружение трамадола и его метаболитов в моче хроматографическими методами // СМЭ. №4. С.38-42.
- Справочник Видаль. “Астра Фарм Сервис” 1999, С.Б665-669, E231.
- Энциклопедия лекарств. Издание 7. М.: РЛС 2000. С.919-923.
- Clarke’s isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids and post-mortem material. –2-nd Ed. –London. 1986. P.1033-1034.

